

人鼠嵌合性单抗构建原则与实验案例

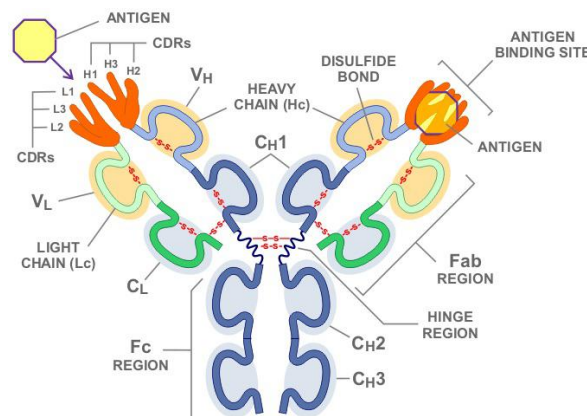
相关服务：[嵌合抗体制备服务](#)

第一代人源化抗体是将鼠 McAb 的可变区和人抗体的恒定区组成嵌合抗体。由于这两部分在空间结构上相对独立，其独特的抗原亲和力和保持得很好，但因为有鼠 McAb 可变区的存在，应用时仍有强烈的 HAMA 反应。

在此基础上，进一步将鼠 McAb 可变区中相对保守的骨架区

(Framework region, FR) 换成人的 FR，仅仅保留抗原结合部位

的互补决定区 (Complementarity-determining region, CDR)，这才是真正意义上的抗体人源化。但起脚手架作用的 FR 不仅提供了 CDR 的空间构象环境，有时还参加抗体结合位点正确构象的形成，甚至参加与抗原的结合。因此，简单的 CDR 移植往往丧失或降低了原抗体的亲和力。如何在 FR 中、FR 和 CDR 之间进行操作，目前有四种策略。



人鼠嵌合抗体构建原则与策略

1.模板替换

使用与鼠对应部分有较大同源性的人抗体 FR 替换鼠 FR，在选择人 FR 时一般有两途径。

第一种是对鼠 McAb 采用同一个(或少数几个)人源 FR 进行替换。已有晶体结构数据的人源抗体的可变区框架(VH 如 NEW，KOL，VL 如 REI 等)用作替换的基本模板，借助序列比较与分子模建确定在人、鼠间有种源差异，尤其是鼠 FR 中与互补决定区 CDR 有密切作用的氨基酸残基，保留在替换的人源 FR 中。为了保持 CDR 的空间构象，要特别注意原来抗体的 CDR 下面的堆积残基，以及 CDR 周围的残基。

该途径的优点在于，确切的人源 FR 晶体结构为残基替换提供了较明确的信息；不足在于不易保持鼠 CDR 的天然构象，很可能降低或丧失抗体的亲和力。

第二条途径是，在已有的抗体序列库中搜寻与鼠 McAb FR 有最大同源性的人源 FR 用以替换。在选择同源的人 FR

时,先前的工作者倡导将 VL 和 VH 作为一个整体来考虑,寻找最高同源的人 FR。其理由是同一个抗体的 VL 和 VH 在折叠上更能匹配。以后的工作者则认为,将 VL 和 VH 分开考虑,分别寻找最高同源的对应序列,更好地保持 FR 原来的框架,在整体上给鼠 CDR 提供最类似的环境。总之,同源替换主要考虑的是,鼠 CDR 在此背景下有类似的折叠环境,从而可保持原来的构象。同样需要分子模建来提供 CDR 移植后可能或缺的 FR 关键残基的信息。同源替换的优点是,能减少需要更改的氨基酸数目,更好地保持 CDR 需要的空间环境;不足的是选择的人源 FR 可能并无结构数据,不能提供有效的关键残基信息。

2.表面重塑

对鼠 CDR 及 FR 表面残基进行镶饰(veneering)或重塑(resurfacing),以使之类似于人抗体 CDR 的轮廓(profile)或人 FR 的型式(pattern)。

表面重塑途径的一个前提是,鼠 McAb 可变区的免疫原性起源于它的表面残基。因为残基的运动性和溶液可及性是其成为抗原决定簇的基本条件,因此表面残基理应携带全部或绝大部分的抗原表位。溶液可及性表面残基的划分标准是一构成该残基的全部原子的 30%以上是溶剂可及的。尽管人、鼠间抗体可变区表面暴露残基的精确型式有差别,但大多数的表面位置的残基类别有强烈的倾向性,仅仅考虑这种表面型式就可分出抗体可变区的组别。这说明抗体可变区表面至少也和框架区核心一样保守,表面型式的差别是人鼠间抗体的主要差别。根据对现有的抗体晶体结构数据的分析结果统计,在序列配对位置上,人、鼠间抗体可变区残基的相对溶剂可及性分布的保真度达 98%。这说明在异种间诱导免疫反应的残基是由其余的种特异性溶液可及表面残基引起的。将鼠特异性表面残基换成人源性的,就可模拟人源抗体的表面轮廓,逃避人体免疫系统的识别,达到人源化的目的。该策略可以不进行同源模建,在序列同源分析的基础上,选择与鼠表面残基暴露类型最相匹配的人源型式进行,但不够准确。另外,如果要改变的残基在侧链大小、电荷、疏水性,或有可能形成氢键从而影响到 CDR 的构象,则不予改变。因为要改变的残基较少,能减少 CDR-FR 之间的不相容性。

该策略作为较新的一种人源化途径,还在逐步成熟阶段。鼠源 McAb 在人体引起的 HAMA 反应,究竟是完全由其

表面的暴露残基引起，还是由表面残基与内部残基的共同贡献，涉及到抗体产生最基本的免疫学机制，而这种机制仍是目前探讨的热点。

3. 补偿变换

在人 FR 选择与 CDR 有相互作用、与抗体的亲和力有密切关系或对 FR 空间结构折叠起关键作用的残基进行改变，以补偿完全的 CDR 移植。

立体结构数据和同源性分析表明：在抗原结合、稳定 CDR 构象、FR 折叠(内部堆积)这几个方面而言，构成抗体 FR 的残基并不具有相同的重要性。以此为依据将这些残基分成 3 类：低风险性(low-risk)残基，即暴露于溶剂而对抗原结合和抗体结构贡献甚少的残基。替代这些位置的残基能降低免疫原性而几乎不影响抗体的亲和力；高风险性(high-risk)残基，即直接参与抗原结合、稳定 CDR 构象或 FR 折叠的残基。为了保持人源化抗体的活性，应尽量避免在这些位置进行替换。对中度风险性(moderate-risk)残基应谨慎从事。FR 中的高风险性残基和某些中度风险性残基，通称为非 CDR 区补充调控残基(non-CDR complementarity modulating residues)。它们散布于线性序列的不同位置，为每个 CDR 回折(loop)提供了合适的“平台”。其形状和侧链大小协同决定 CDR 的基本构象，并影响其抗原结合的特异性。因而将 CDR 搬到人源 FR 后，必须将人 FR 中的这些位置替换成鼠源非 CDR 区补充调控残基以补偿完全的 CDR 移植。

这种分析方法使人源化突变方案具有选择性和针对性，避免了盲目的可能导致失败的探索。通过在中度风险性残基中进行变化，还有可能提高人源化抗体的亲和力。不足的是对残基的分类要以晶体数据和三维结构为基础，才能提供准确的标准。

4. 定位保留(positional consensus method)

人源化 McAb 保留了鼠源 McAb 可变区中参与抗原结合的氨基酸残基，包括 CDR 和 FR 中的一些关键残基。尽管鼠框架区的其余部分可以从某个人 FR 中搬移过来，毫无疑问，这样得到的人源化抗体序列和人抗体的保守序列(consensus sequences)在一些位置上有差别。这些来源于个体型抗体亲和力成熟过程中体细胞突变的非典型残基，应用于病人后会诱导免疫反应。因此，理想的途径是，以人 FR 保守序列为模板进行人源化。由于人抗体轻、

重链可变区不同亚类的保守序列并不相同，需要一种合适的方法来寻找最适保守序列。最简位置模板(minimal positional template)表明，抗体可变区中哪些位置绝对需要保持抗体的抗原结合结构域的完整性，提供了确定关键位置的方法。

在选择人框架区时，首先从现有的人源抗体保守序列中搜寻与鼠框架区最类似的序列；其次根据最简位置模板确定鼠可变区的关键位置残基；最后保留所有这些位置而将其余部分进行人源化。

以上所述人源化的四种策略均以保持抗体的亲和力为核心，以降低免疫原性为目标，各有特点。总之，[抗体人源化](#)设计的关键步骤是：

从同源抗体中或共同序列抗体中选择人源 FR。

根据已发表的信息，确定 FR 中起关键作用的氨基酸。

以鼠 McAb 可变区立体模型作指导。

在设计过程中，同源分析和分子模建提供了必需的辅助手段。虽有一些一般性原则，但对某一具体的鼠 McAb 进行人源化时则必须具体分析。

实验案例—人鼠嵌合抗体重链基因转染小鼠骨髓瘤细胞

本文介绍了通过人鼠嵌合抗体重链基因转染小鼠骨髓瘤 J558L 的研究，较详尽地阐述了用原生质体融合法将重组的人鼠嵌合抗体重链基因转染到 J558L 骨髓瘤细胞中，并用 ELISA 法检测转染子的过程和方法。

实验材料

细胞株：骨髓瘤细胞株 J558L，本身能合成免疫球蛋白 λ 轻链多肽，但不分泌到细胞外。

供体菌株：E.coli HB101，带有含人鼠嵌合抗体重链基因的 pSV2 Δ HgptS107VHHuG4 质粒。

细胞长生培养基：IMDM + 1%庆大霉素 + 1%制霉菌素 + 10%小牛血清。

H×M：选择培养基 + 次黄嘌呤 (0.45ug/ml) + 黄嘌呤 0.03mg/ml + 霉酚酸 (0.6mg/ml)。

羊抗人 IgG：辣根过氧化物酶标的绵羊抗人 IgG。

溶菌酶溶液：5mg/ml 溶在 250mmol/L Tris 溶液 (PH 8.0) 。

PEG-DMSO：47.1% PEG1500-12.5% DMSO-100mmol/L Tris，用 DME 配制。

实验方法

- **细菌的培养**：接种 E.coli HB101 (含质粒) 于 LB 液体培养基中，含 50ug/ml 的氨基苄青霉素，37°C 振荡培养过夜。第二天以 1010 接种量接于 100ml LB 培养基中，37°C 振荡培养至 OD 600 达到 0.5，加入氯霉素至终浓度 125ug/ml，培养 12h，扩增。
- **原生质体的制备**：取上述培养的细菌，加到灭菌的离心管中，4000×g 离心 15 分钟，取沉淀，按每个 OD600 加 10ml 蔗糖—溶菌酶溶液使其终浓度分别为 2%和 0.5mg/ml，轻轻摇动，置冰上 5 分钟，加入 2ml 冷的 250mmol/L EDTA (PH8.0) 轻轻旋动，37°C，保持 8 分钟 30 秒。然后分四次加入 40ml 的 10%超纯蔗糖-10mmol/L MgCl₂-DME (5ml，5ml，10ml，20ml) 室温放置 30 分钟，备用。
- **原生质体与骨髓瘤细胞的融合**：取生长状态良好的骨髓瘤 J558L 细胞悬液 5ml，2000×g 水平离心 7 分钟，吸掉培养基，用 DME 洗一次。加入 5ml 上述的细菌原生质体悬液，悬浮细胞沉淀物，混匀，2000×g 室温离心，7 分钟，弃去上清。弹松沉淀、加入 0.5ml PEG-DMSO 液，室温振荡 1 分钟，加入 0.5ml 25% PEG-100mmol/L Tris，摇动 2 分钟。然后加入预先保温的 DEM 10ml，稀释细胞悬液，2000×g 室温离心 6 分钟，弃去上清液，向沉淀中滴加 12ml 细胞的生长培养液。混匀后在 96 孔培养板的每孔中加 2 滴，于 CO₂ 培养箱中 37°C 培养。
- **转染子的筛选**：经上述转染的细胞在 37°C 培养 2 天后，在每孔，2 滴选择培养基，又经过 4 天后，吸出一半培养基，补加新鲜的选择培养基。其后，不定期地用选择培养基换液。

抗体的检测：经上述转染的细胞在 37°C 培养后，检测抗体。采用 ELISA 法检测转染子所表达的嵌合抗体。

更多阅读

[全人源化单克隆抗体制备技术 \(转基因小鼠 \)](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势



支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫



记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性



单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失



重轻链天然配对,亲和力更优



高通量,周期短,单抗发现快至29天



ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



小鼠



兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

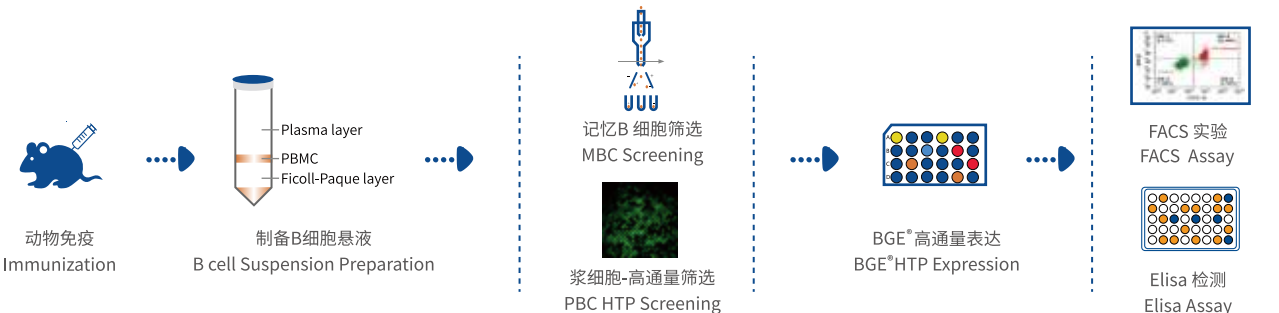


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

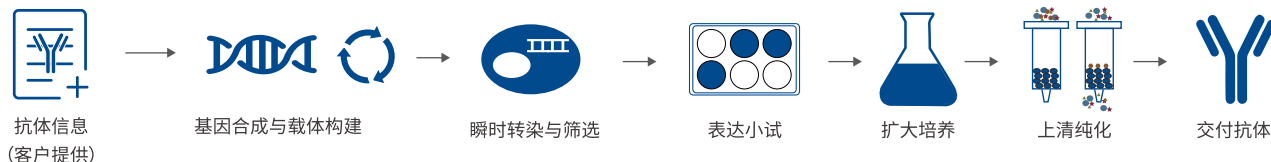
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

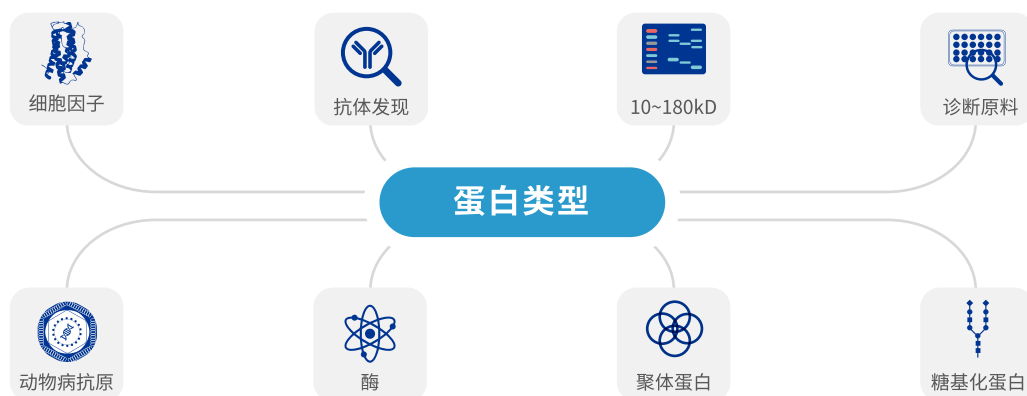


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

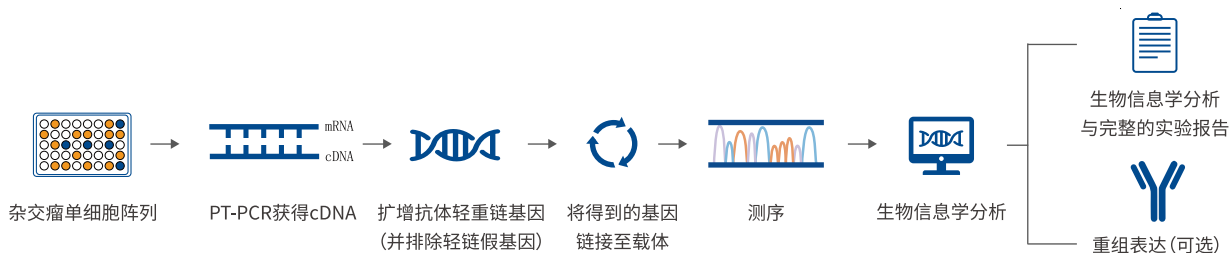
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



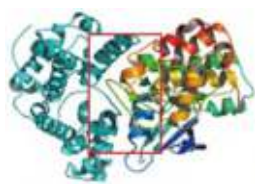
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



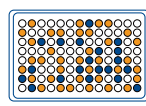
基因合成&质粒抽提



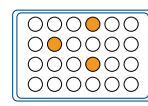
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L